

文章编号: 1000-1190(2006)03-0407-05

甲醛致斜纹夜蛾 SL-1 细胞 DNA 损伤作用的研究

甘耀坤¹, 杨光涛², 彭光银², 吴 凯², 刘凯于², 杨 旭^{2*}

(1. 广西玉林师范学院 化学与生物系, 广西 玉林 537000; 2. 华中师范大学 生命科学学院, 武汉 430079)

摘 要: 为了研究甲醛致昆虫细胞 DNA-蛋白质的交联作用(DNA-protein crosslinks, DPC)和 DNA 的断裂作用,以斜纹夜蛾 SL-1 细胞为材料,采用 KCl-SDS 沉淀法和彗星实验来检测液态甲醛染毒后 SL-1 细胞中 DPC 的含量及 DNA 的断裂效应. KCl-SDS 沉淀法的结果表明,低浓度的液态甲醛(25 $\mu\text{mol/L}$, 125 $\mu\text{mol/L}$)不能引起 DPC,较高浓度(625 $\mu\text{mol/L}$)可以引起明显的 DPC($P < 0.01$);而彗星实验的结果则显示甲醛在低浓度(5 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$)时可以引起 DNA 链的断裂($P < 0.01$),在较高浓度(625 $\mu\text{mol/L}$)时尾部 DNA % 和尾矩比空白对照显著降低($P < 0.01$),表明此时甲醛所致的 DPC 掩盖了 DNA 断裂的作用. 结论是甲醛在较高浓度时可以导致明显的 DPC 作用,而在低浓度时以 DNA 断裂为主.

关键词: 甲醛; DNA 损伤; 斜纹夜蛾 SL-1 细胞

中图分类号: Q523

文献标识码: A

甲醛作为一种常见的装修型化学性室内空气污染物和生物内源性有机化合物,因其来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点,已成为我国主要的室内空气污染物之一. 许多研究证实,甲醛具有遗传毒性和致突变性,可以导致 DNA 的断裂作用(DNA single strand break, DSSB)、DNA-DNA 交联(DNA-DNA crosslinks, DDC)以及 DNA-蛋白质交联(DNA-protein crosslinks, DPC)^[1]. 本研究以斜纹夜蛾卵巢细胞系 SL-1 细胞为材料,采用 KCl-SDS 沉淀法和彗星实验相结合的方法对甲醛所致 DPC 和 DNA 断裂效应进行了探讨,以期更全面更系统地了解甲醛对昆虫细胞 DNA 的损伤作用.

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

仪器:CO₂ 培养箱(日本岛津),超净工作台(苏州净化科学仪器厂),低温冷冻离心机(Eppendorf-5415R),三用电热恒温水箱(北京市长源实验仪器厂),荧光分光光度计(F-4500,日本日立),DYY-11B 型三恒电泳仪和 DYY- 型电泳槽(北京市六一仪器厂),BH-2 型荧光显微镜

(OL YMPUS),0.635 cm 450 万像素数码相机(Nikon).

试剂:10%的福尔马林溶液(SIGMA 公司),十二烷基硫酸钠(Merk 公司),蛋白酶 K(Merk 公司),Hoechst33258 荧光染料(SIGMA 公司),Grace's 培养基(GIBCO 公司),胎牛血清(GIBCO 公司),小牛胸腺 DNA(SIGMA 公司). 正常熔点琼脂糖(Shanghai),低熔点琼脂糖(Premega),吡啶橙(A. O),PBS 缓冲液(无 Ca²⁺、Mg²⁺),0.4% 苕盼蓝溶液,其他试剂均为分析纯.

1.2 细胞的培养与传代

斜纹夜蛾 SL-1 细胞,由中山大学国家生物防治重点实验室从斜纹夜蛾成虫的卵巢建系,并赠予华中师范大学昆虫所. 细胞需以 Grace's 培养基加 7%胎牛血清(GIBCO 公司)培养,培养温度为 28℃,每 3 d 传 1 代,传代时细胞按 1 × 10⁶ mL 密度接种.

1.3 液态甲醛体外染毒方法

将传代 24 h 后的斜纹夜蛾 SL-1 细胞轻轻从瓶壁吹下,制成细胞悬液. DPC 实验中向每个 1.5 mL 的离心管中各加入 0.5 mL 细胞悬液,然后加入甲醛,其终浓度分别为 12 $\mu\text{mol/L}$ 、

收稿日期: 2006-03-17.

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570799); 武汉市重点科技攻关项目(20056002058)资助.

作者简介: 甘耀坤(1957-),女,广西玉林人,副教授,主要从事生物化学的研究与教学工作. *通讯联系人,Email: yangxu@mail.ccnu.edu.cn.

125 $\mu\text{mol/L}$ 、650 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入蒸馏水. 彗星实验中向每个 1.5 mL 的离心管中各加入 0.5 mL 细胞悬液, 然后加入甲醛其终浓度分别为 5 $\mu\text{mol/L}$ 、12 $\mu\text{mol/L}$ 、125 $\mu\text{mol/L}$ 、625 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入蒸馏水. 置于 CO_2 培养箱 (28 $^{\circ}\text{C}$) 中, 染毒 60 min.

1.4 DPC 的检测——KCl-SDS 沉淀法^[2-7]

1.4.1 KCl-SDS 沉淀法的原理 SDS 可以和 DPC 以及其他的蛋白结合, 而不和自由的 DNA 结合, 在向样品中加入 KCl 溶液时可使 DPC 和蛋白质沉淀下来, 而自由的 DNA 留在上清液中. 将上清液转移后, 再向沉淀中加入蛋白酶 K 除去蛋白质使 DPC 中的 DNA 游离出来, 并用荧光法测定此 DNA 的含量以及原液中 DNA 的含量, 计算交联 DNA 和总 DNA 的比值, 进而得出 DNA 和蛋白质的交联程度. $\text{DPC 系数} = \frac{\text{交联 DNA}}{\text{交联 DNA} + \text{自由 DNA}}$.

1.4.2 细胞的裂解 染毒后以 6 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清液, 用 0.5 mL PBS (pH = 7.5) 重悬浮细胞. 在制备好的细胞悬液中分别加入 0.5 mL 2% 的 SDS 溶液并轻微振荡, 然后将混合液放在 65 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中加热 10 min, 裂解细胞.

1.4.3 游离 DNA 的分离 从水浴中取出加入溶于 20 mmol/L Tris-HCl 的 1.0 mol/L 的 KCl (pH 7.5) 100 μL , 将混合液 6 次穿过 1 mL 的聚丙烯枪头, 从而使 DNA 长度统一 (因 DNA 片段的长度可影响该方法的准确性). 由于 SDS 可以和游离的蛋白质及 DNA-蛋白质交联物结合而沉淀下来, 而游离的 DNA 留在悬液中. 在冰上冷冻样品 5 min 后, SDS- K^+ 沉淀 (包括蛋白质和 DPC) 可以形成, 然后 10 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 5 min 收集沉淀, 并将上清转入另一离心管 (5 mL) 中. 再加入 1 mL 的清洗缓冲液 (0.1 mol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 重悬浮沉淀, 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min, 冰上骤冷 5 min, 如前述离心, 如此清洗 3 次, 每次都应将上清转入上述离心管中.

1.4.4 DPC 中结合 DNA 的分离 最终的沉淀重悬浮于 0.5 mL 的清洗缓冲液中, 然后加入 0.5 mL 的蛋白酶 K (0.4 g/L, 溶于清洗缓冲液中配制), 50 $^{\circ}\text{C}$ 消化 3 h, 从水浴中取出冰上骤冷 5 min, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$, 离心 10 min 收集上清液 (其中包括 DPC 中的 DNA).

1.4.5 DPC 的定量 先制作 DNA 浓度的标准曲线: 用清洗缓冲液配制终浓度分别为 0 $\mu\text{g/L}$,

100 $\mu\text{g/L}$, 300 $\mu\text{g/L}$, 500 $\mu\text{g/L}$, 750 $\mu\text{g/L}$, 1 000 $\mu\text{g/L}$, 1 500 $\mu\text{g/L}$, 2 000 $\mu\text{g/L}$, 3 000 $\mu\text{g/L}$, 5 000 $\mu\text{g/L}$ 的小牛胸腺 DNA 标准液, 紧接着加入 1 mL 新鲜配制的 400 $\mu\text{g/L}$ 的荧光染料 Hoechst 33258, 使终浓度为 200 $\mu\text{g/L}$, 置于暗处 30 min, 用 F-4500 型荧光分光光度计在 353 nm 激发光和 455 nm 发射光下测得各浓度的荧光值, 制备标准曲线 (图 1).

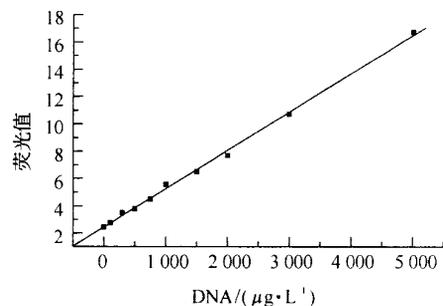


图 1 DNA 浓度的标准曲线

将染色后的样品用 F-4500 型荧光分光光度计测定其荧光值, 根据标准曲线来定量交联 DNA 和自由 DNA, 再计算 DPC 系数.

1.5 彗星实验

在细胞核中, DNA 是环状附着在核基质上, 在细胞裂解过程中, 核基质被溶解、抽提, DNA 则仍保留一核样结构. 如果 DNA 链上存在缺口, 其超螺旋变得松弛^[8], 在电场力作用下, 松动的 DNA 环将向阳极迁移. 但这种松动的 DNA 环其一端仍然附着于核 DNA, 其迁移距离受到限制. 因此, 含 DNA 链缺口越多, 则进入尾部的 DNA 越多, 表现为尾长和尾部荧光强度的增加. 未损伤细胞在电场中 DNA 停留于核中形成圆形的荧光团, 而损伤的细胞除了核 DNA 光团 (彗星头) 外, 还有迁移的 DNA 形成的彗星尾, 从而形成了特有的电泳形态.

1.5.1 实验方法^[8-11]

(1) 染毒后以 6 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清液, 用 0.5 mL PBS (pH 7.5) 重悬浮细胞.

(2) 在完全磨毛的载玻片 (75 mm \times 25 mm) 上铺第一层 180 μL 质量分数为 1% 的正常熔点的琼脂糖 (NMA); 待其凝固后, 铺第二层 100 μL 质量分数为 1.0% 的低熔点琼脂糖 (LMA) 和细胞悬液的混合液 (体积比为 3 : 1); 第二层凝胶固化后, 铺第三层质量分数为 0.8% 的低熔点琼脂糖 100 μL . 固化条件均为 4 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 10 min.

(3) 将制备的凝胶放入冷的裂解液 (2.5 mol/L NaCl, 100 $\mu\text{mol/L}$ Na_2EDTA ,

10 $\mu\text{mol/L}$ Tris, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 1% TritonX-100, 10% DMSO, pH10) 中, 4 下裂解 2 h.

(4) 然后放入蒸馏水中漂洗 3 min, 以洗去凝胶表面的盐分, 再放入电泳槽中. 将新鲜配置的电泳缓冲液 (1 $\mu\text{mol/L}$ Na₂EDTA, 300 $\mu\text{mol/L}$ NaOH, pH13) 倒入电泳槽, 约覆盖过玻璃片 0.25 cm, 盖上盖子, 静置 20 min 使双链 DNA 解螺旋. 调节电泳液液面高度, 于 13 V, 115 mA 下电泳 20 min.

(5) 电泳完毕, 取出载玻片浸入 0.4 mol/L Tris 缓冲液 (pH7.5) 中中和. 用吖啶橙 (20 mg/L) 染色 5 min, 双蒸水洗掉表面的染料, 24 h 内在荧光显微镜下观察.

1.5.2 实验数据统计分析 分析不同浓度甲醛作用下单个细胞的拖尾率. 通过荧光显微镜观察细胞, 并由数码相机拍摄, 在电脑上用 CASP 彗星图象分析软件 (从 <http://www.casp.of.pl/> 下载) 自动分析. 分析指标为国际公认的 Tail DNA % 和 Tail moment. 实验测得的数据用 SigmaPlot9.0 统计分析软件分析, 进行双尾 *t* 检验, 并作图.

2 实验结果

2.1 液态甲醛致 DPC 效应

当甲醛浓度为 25 $\mu\text{mol/L}$ 和 125 $\mu\text{mol/L}$ 时, DNA-蛋白质交联含量与对照组 (加入蒸馏水) 相

比没有显著差异 ($P > 0.05$); 当甲醛浓度为 625 $\mu\text{mol/L}$ 时, DPC 含量与对照组相比有显著差异 ($P < 0.01$, 图 2). 该结果反映: 甲醛在低浓度时, 不引起 DNA-蛋白质交联作用, 或交联不明显; 随着浓度升高时, 甲醛能够显著地诱导 DPC 的产生.

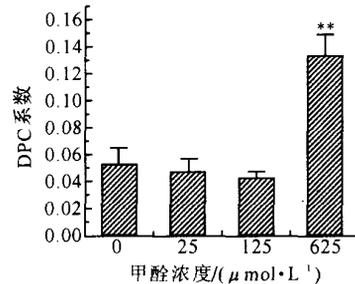


图 2 液态甲醛体外染毒致 DPC 效应
(* *表示 $P < 0.01$, 与对照组有极显著差异)

2.2 彗星实验检测 DPC 和 DNA 断裂的结果

实验结果 (图 3) 表明甲醛在低浓度 (5 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$) 时主要以引起细胞 DNA 链断裂为主 ($P < 0.01$), 而在较高浓度 (625 $\mu\text{mol/L}$) 时, 则主要引起交联作用 ($P < 0.01$), 这主要是由于断裂的 DNA 大部分与蛋白质发生了交联, 实验结果与 DPC 实验结果相吻合.

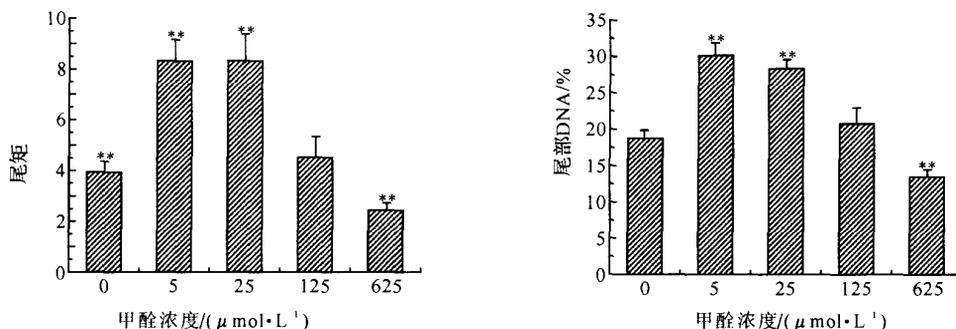


图 3 A: 甲醛浓度与尾矩; B: 甲醛浓度与尾部百分 DNA %
(* *表示 $P < 0.01$, 与对照组有极显著性差异)

3 讨论

3.1 甲醛对 DNA 的损伤

甲醛具有广泛的遗传毒性, 其主要和直接的遗传毒性效应就是损伤 DNA, 损伤主要包括 DNA 断裂和 DNA 交联. DNA 断裂如果不能及时修复,

就会导致突变, 更关键的是, 它还会阻碍细胞分裂所必需的 DNA 复制过程, 从而导致细胞死亡. 有研究表明, 甲醛仅能与 DNA 单链发生作用形成 DPC, 这提示我们 DPC 只可能在转录或复制的过程中形成. DPC 的存在阻滞了 DNA 的正常转录和复制, 会导致染色体断裂、缺失, 基因突变和细胞的

死亡.因此 WHO 在其文件中指出[WHO, 2002], DPC 可以作为机体潜在突变的分子标志物^[12].

3.2 甲醛作用机理

甲醛是醛类化合物中最简单的小分子,其毒性效应的一个重要方面是源于它的羰基亲电性和较小的空间位阻,使其易于攻击核酸产生断裂,已有不少研究证实,甲醛可以引起机体抗氧化系统的损害如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性的降低,还原型 GSH 的耗竭;甲醛进入细胞后可以打开线粒体上的线粒体渗透性转运通道,抑制线粒体的呼吸作用,产生更多的活性氧自由基(ROS),使得细胞或机体内的氧化压力增加^[13].即甲醛可以通过多种途径破坏机体的氧化平衡状态,使得机体内的 ROS 水平增加,进而对核苷酸进行攻击产生 DNA 断裂^[14].甲醛损害生物体抗氧化系统或作为抗氧化酶的抑制剂,也间接导致 DPC 的增加.例如甲醛引起的还原性 GSH 耗竭,抑制 GSH-PX 和 SOD 等抗氧化酶的活性,使羟自由基和氧自由基清除不力,导致 DPC 含量的增加^[15],因此可以考虑用 DNA-蛋白质交联和红细胞 GSH 含量作为“内暴露生物标志物”.在体内或体外甲醛先与蛋白质或核酸上的自由的氨基反应生成不稳定的羟甲基加合物,然后再进一步与核酸或蛋白质反应形成稳定的交联物.甲醛所致 DPC 主要是由组蛋白上的赖氨酸残基和 DNA 上的鸟嘌呤共价结合而成,其过程是甲醛先和赖氨酸或鸟嘌呤上的一级胺结合形成羟甲基中间体,该中间体再脱去一分子水形成亚甲基 Schiff 碱,最后在赖氨酸和鸟嘌呤之间形成亚甲基桥. DPC 的主要形式可表示为: histone-NH-CH₂-NH-DNA^[16,17].

3.3 结果

SL-1 细胞是斜纹夜蛾卵巢细胞系.本实验以 SL-1 细胞为材料,进行体外染毒,在浓度选择上跨越了低中高浓度范围,采用 KCl-SDS 沉淀法和彗星实验对甲醛引起 SL-1 细胞 DNA-蛋白质交联效应及其 DNA 断裂作用的能力进行了探讨.实验结果显示:甲醛致细胞 DNA 的损伤作用的方式与浓度有关,甲醛在低剂量时,主要引起 DNA 链的断裂,交联现象不明显或不诱导该现象;随着浓度升高,甲醛可显著诱导 DPC 的形成.这主要是因为甲醛作用 DNA 后对其攻击导致 DNA 链的断裂,随着甲醛浓度的升高 DNA 链的断裂也在升高,甲醛又诱导断裂 DNA 与蛋白质发生交联,所以在高浓度,断裂的 DNA 大部分与蛋白质发生了交联,

DPC 系数显著升高,彗星实验的彗尾发生缩短,甚至低于空白对照组.

参考文献:

- [1] Conaway C C, Whysner J, Verna L K, et al. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation[J]. *Pharmacol Ther*, 1996, **71** (1-2):29-55.
- [2] Zhitkovich A, Costa M A. Simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo [J]. *Carcinogenesis*, 1992, **13**(8): 1 485-1 489.
- [3] Kuykendall J R, Trela B A, Bogdanffy M S. DNA-protein crosslink formation in rat nasal epithelial cells by hexamethylphosphoramide and its correlation with formaldehyde production[J]. *Mutation Research*, 1995, **343**: 209-218.
- [4] Chakrabarti S K, Bai C J, Subramanian K S. DNA-protein crosslinks induced by nickel compounds in isolated rat renal cortical cells and its antagonism by specific amino acids and magnesium ion[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, **154**: 245-255.
- [5] 彭光银,刘英帅,段丽菊,等. 甲醛对 DNA 断裂和交联的损伤作用[J]. *公共卫生与预防医学杂志*, 2005, **2**(16):35-37.
- [6] 刘英帅,鲁志松,杨继文,等. 甲醛致人血淋巴细胞 DNA-蛋白质交联作用的定量研究[J]. *湖北预防医学杂志*, 2004, **15** (4): 4-7.
- [7] Liu Chang, Zhisong Lu, Shumao Ding, et al. Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks [J]. *Front Biosci*, 2006 **11**(1): 991-997.
- [8] Cook P R, Brazell I A. Conformational constraints in nuclear DNA[J]. *J Cell Sci*, 1976, **22**:287-290.
- [9] Tice R R, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell Gel/Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, **35**: 206-221.
- [10] 鲁志松,严彦,乔琰,等. 气态甲醛对人体颊黏膜细胞遗传毒性的研究[J]. *中国环境科学*, 2003, **23**(6):566-569.
- [11] 甘耀坤,乔琰,鲁智松,等. 用单细胞凝胶电泳技术检测斜纹夜蛾 5B 细胞 DNA 损伤的研究[J]. *华东昆虫学报*, 2004, **13**(1):38-41.
- [12] WHO. Concise International chemical assessment document 40: formaldehyde[R]. World Health Organization, Geneva, 2002: 12-16.
- [13] Teng S, Beard K, Pourahmad J, et al. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2001: 130-132; 285-296.
- [14] 刘杰,刘宏亮,王光学,等. 气态甲醛对小鼠不同组织器官 SOD 的抑制作用[J]. *环境与健康杂志*, 2003, **20**(2):81-83.
- [15] 罗纪盛,顾亦军,张艳萍,等. GSH 对甲醛的解毒作用[J]. *华东师范大学学报:自然科学版*, 1995, **1**:101-106.

- [16] Bunde R L, Jarvi E J, Rosentreter J J, et al. A piezoelectric method for monitoring formaldehyde induce crosslink formation between poly-lvsine and polydeoxyguanosine[J]. *Talanta*, 2000, **51**: 159-171.
- [17] Quievryn G, Zhitkovich A. Loss of DNA-protein crosslink from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteosome function [J]. *Carcinogenesis*, 2000, **21**(8): 1573-1580.

Study on DNA damages of *Spodoptera litura* SL-1 cells induced by formaldehyde

GAN Yaokun¹, YANG Guangtao², PANG Guangyin²,
WU Kai², LIU Kaiyu², YANG Xu²

(1. Department of Chemistry and Life Science, Yulin Normal College of Gangxi, Yulin, Gangxi 537000;

2. College of Life Science, Central China Normal University, Wuhan 430079)

Abstract : To study the effect of formaldehyde inducing DNA-protein crosslinks (DPC) and DNA single strand break (DSSB) in insect cells, this study took *Spodoptera litura* SL-1 cells as experimental material and made use of KCl-SDS assay and comet assay to determine the amount of DNA-protein crosslinks and effect of DNA damages induced by liquid formaldehyde. From the KCl-SDS assay results formaldehyde can not cause DPC at low levels (25 $\mu\text{mol/L}$, 125 $\mu\text{mol/L}$), but at higher levels (625 $\mu\text{mol/L}$) can cause DPC obviously ($P < 0.01$). According to comet assay, it can cause DNA strand breakage (DSSB) at low levels (5 $\mu\text{mol/L}$, 25 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$) and cause crosslinks at higher levels (625 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$). From the above results this paper can conclude that formaldehyde can cause DPC at higher, at lower levels the mostly action is DSSB.

Key words : formaldehyde; DNA damages; *Spodoptera litura* SL-1 cells